

研究種目：若手研究B

研究期間：2008 年～2009 年

課題番号：20790323

研究課題名（和文） 赤痢アメーバの貪食過程に関わるイノシトールリン脂質を介した分子機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of phosphatidylinositol mediated molecular mechanisms that related to phagocytosis process of the *Entamoeba histolytica*.

研究代表者

津久井久美子 (Tsukui Kumiko)

国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官

研究者番号：00420092

研究成果の概要（和文）：phosphoinositides [PtdIns]の寄生性原虫の貪食過程における役割を知るため、phosphatidylinositol-3-phosphate [PtdIns(3)P]と PtdIns-P 結合タンパク質と考えられる分子の結合を腸管寄生性原虫赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*) で明らかにした。以前に示されているように、貪食は赤痢アメーバの病原因子であり PtdIns 3-kinase 阻害剤で阻害される。我々は動画撮影により貪食開始時に PtdIns(3)P のマーカーである GFP-Hrs-FYVE が phagocytic cup、貪食胞、細胞膜と貪食胞をつなぐ細い管上の構造へ動員されることを示した。赤痢アメーバには 12 の FYVE ドメインタンパク質(EhFP1-12)があり、11 は EhoGEF/DH ドメインを持っていた。そのうち EhFP4 が管上の構造と細胞膜側の貪食胞上へ動員された。さらに EhFP4 は 10 の高発現している Rho/Rac 低分子量 GTPase のうち 4 分子と結合した。リン脂質との結合特異性を検討したところ、EhFP4 は C-末端領域を介して PtdIns(4)P と結合し、FYVE ドメインはその結合特異性を制御すると考えられた。EhFP4 の FYVE ドメインの高発現により貪食は阻害されたが、Hrs-FYVE の高発現で貪食は促進された。以上より、PtdIns(3)P、PtdIns(4)P と EhFP4 が協調してこの寄生性原虫の貪食を制御していることが示された。以上の結果は Cellular Microbiology, 11:1471-91(2009)に発表された。

研究成果の概要（英文）：To understand the roles of phosphoinositides [PtdIns] in phagocytosis of parasitic eukaryotes, we examined the interaction of phosphatidylinositol-3-phosphate [PtdIns(3)P] and putative PtdIns-P-binding proteins during phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. It was previously shown that phagocytosis in *E. histolytica* is indispensable for virulence and is inhibited by PtdIns 3-kinase inhibitors. We demonstrated by time-lapse live imaging that during the initiation of phagocytosis, the PtdIns(3)P biomarker GFP-Hrs-FYVE, was translocated to the phagocytic cup, phagosome, and to tunnel-like structures connecting the plasma membrane and phagosomes. *E. histolytica* possesses 12 FYVE domain-containing proteins (EhFP1-12), 11 of which also contain the RhoGEF/DH domain. Among them EhFP4 was shown to be recruited to the tunnel-like structures and to the proximal region of the phagosome. We further demonstrated that EhFP4 physically interacted with 4 of 10 predominant Rho/Rac small GTPases. Phosphoinositide binding assay showed that EhFP4 unexpectedly bound to PtdIns(4)P via the carboxyl-terminal domain and that the FYVE domain modulates the binding specificity of EhFP4 to PtdIns-P. Expression of the FYVE domain from EhFP4 inhibited phagocytosis while enhancement was observed when mammalian Hrs-FYVE domain was expressed. Altogether, we demonstrated that PtdIns(3)P, PtdIns(4)P and EhFP4 coordinately regulate phagocytosis and phagosome maturation in this parasitic eukaryote.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：原虫

1. 研究開始当初の背景

腸管寄生性原虫赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の食食は重要な病原機構であるが、その分子レベルでの理解は不十分である。我々はイノシトールリン脂質 [PtdIns] のひとつ、フォスファチジルイノシトール 3 リン酸 [PtdIns(3)P] が食食胞へ速やかに動員されることを見いだした。原虫ゲノムデータベースに既知の PtdIns(3)P エフェクターが存在しないこと、食食における PtdIns(3)P の動態が動物細胞や酵母と大きく異なることから、ユニークな分子機構の存在が予想された。

2. 研究の目的

赤痢アメーバの食食に於けるイノシトールリン脂質を介したシグナル伝達の解明

3. 研究の方法

- (1) PtdIns(3)P と食食との関与。PtdIns(3)P 結合ドメインである哺乳類 Hrs 分子由来の FYVE ドメインと GFP との融合タンパク質 GFP-Hrs-FYVE を赤痢アメーバに発現させ、PtdIns(3)P の生きた細胞での局在を可視化した。ライブイメージングにより食食時の局在変化を検討した。
- (2) PtdIns(3)P エフェクター分子の検索。赤痢アメーバゲノムデータベースから FYVE ドメインを持つタンパク質を検索し、PtdIns(3)P シグナルの下流で働くと考えられる分子を発見した。
- (3) EhFP4 分子の解析。(2)より得られ

た結果から FYVE ドメインと RhoGEF ドメイン (Rho small GTPase の活性化を行う) を持つ分子群のうち、EhFP4 が食食胞へ動員されることを見出した。そこで EhFP4 分子が活性化する Rho/Rac 分子の特定、EhFP4 の脂質結合特異性を検討し、食食過程における役割を明らかにした。

- (4) EhFP4 と Hrs 由来 FYVE ドメインの高発現による食食への影響。GFP と融合した EhFP4 と Hrs 由来 FYVE ドメインを発現する赤痢アメーバを用いて、2 μ m ビーズと動物細胞 (CHO 細胞) 食食への影響を検討した。

4. 研究成果

- (1) PtdIns(3)P の局在。GFP-Hrs-FYVE によって可視化される PtdIns(3)P の局在は初期エンドソームではない細胞内の小胞にあり、食食時には食食胞へ動員された。よって PtdIns(3)P は食食胞成熟に関与すると考えられた。

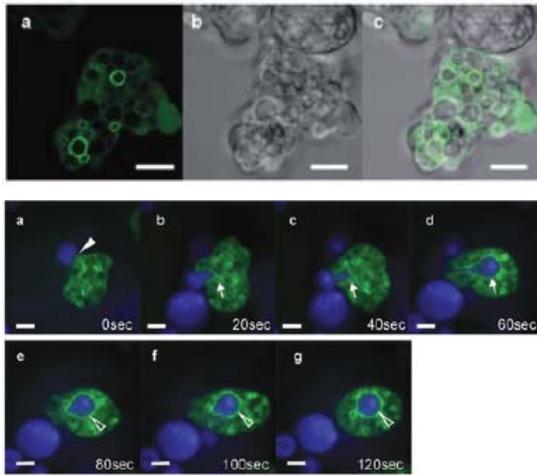


図1 定常状態と食食時の PtdIns(3)P の局在。(上)定常状態における PtdIns(3)P の局在を GFP-Hrs-FYVE によって可視化した。緑が GFP-Hrs-FYVE [PtdIns(3)P]のシグナル。(下)青く染めた CHO 細胞を食食する GFP-Hrs-FYVE 発現赤痢アメーバ。食食胞への PtdIns(3)P の動員が観察される。(Bar: 10µm)

- (2) PtdIns(3)Pエフェクター分子の検索。赤痢アメーバゲノムデータベースより、FYVEドメインを持つ分子を検索したところ、12の分子が発見された (*E. histolytica* FYVE domain containing protein: EhFP)。内11の分子はRho低分子量GTPaseの活性化を行うRhoGEFドメインを持っていた。これらの分子の中で食食とかわる分子を見つけるため、全ての分子をタグ配列との融合タンパク質として赤痢アメーバに発現させ、4つの分子について局在の検討を行った。うち、EhFP4分子だけが食食胞の入り口となる管状の構造と細胞膜側の食食胞への局在を示し、食食への関与が考えられた。さらにEhFP4の局在はF-アクチンと重なることからRhoGEF活性を介して細胞骨格を制御することが示唆された。

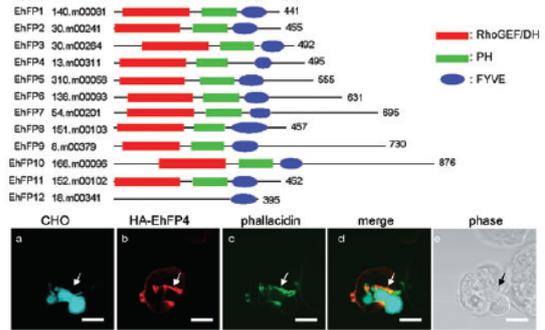


図2 EhFP タンパク質と EhFP4 の食食胞への局在。(上)EhFP 分子。12あるうち11の分子がRhoGEFドメインを持っている。(下)EhFP4の食食時の局在。HA タグを付けたEhFP4を発現する赤痢アメーバを用いて、青く染めたCHO細胞食食時の局在を示した。F-アクチンの局在をBODIPY FL phalloidinで示した(緑色)。(bar; 10µm)

- (3) EhFP4の機能。EhFP4の食食過程における役割を知るため、脂質結合特異性、Rho/Rac分子との結合特異性を検討した。EhFP4の各種欠損ミュータントの組み換えタンパク質を作成し、ニトロセルロース膜上に固定した脂質分子に対する結合特異性を検討した(図3)。この結果よりEhFP4は全長でPtdIns(4)Pと結合し、その結合はFYVEドメイン下流のC-末端領域により担われていること、FYVEドメインのポイントミュータントでPtdIns(4)Pへの特異性が低下することが明らかとなった。続いて赤痢アメーバに存在する25のRho/Rac分子のうち、マイクロアレイデータをもとに発現の高い10分子について組み換えタンパク質を作成し、EhFP4との結合特異性を検討した(図4)。検討したうち、4分子が特異的にEhFP4と結合したこと、その結合はRhoGEFドメインを介して起きていたことから、EhFP4はこれら4つのRho/Rac分子に対する特異的なGEFとして働き、F-アクチンの重合を促すと考えられた。

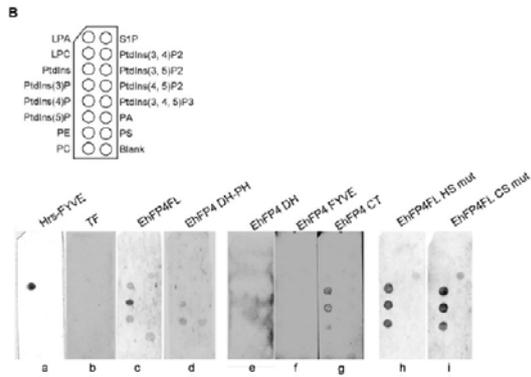
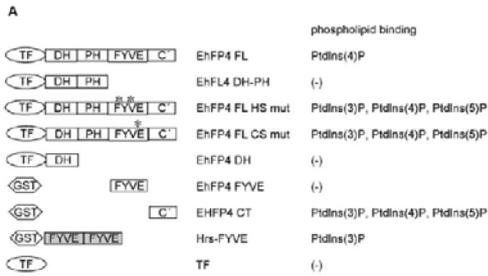


図3 EhFP4 の脂質結合特異性。(A) 使用した EhFP4 組み換えタンパク質の模式図。(B) 対応する組み換えタンパク質の各種脂質に対する結合特異性。

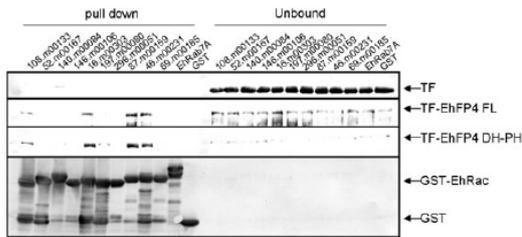
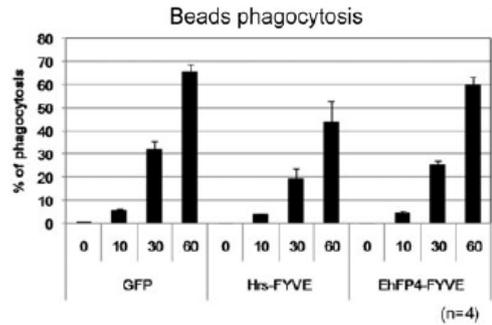
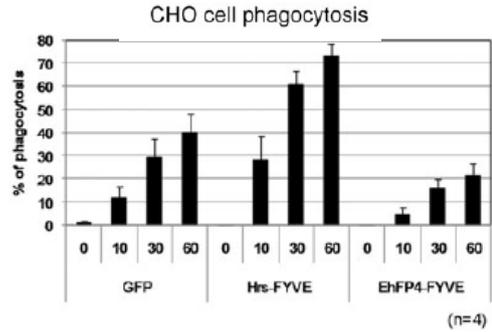


図4 EhFP4 と各 Rho/Rac 分子との結合特異性。trigger factor (TF) と His タグを含む全長もしくは RhoGEF ドメインのみの EhFP4 組み換えタンパク質と GST タグを含む各種 Rho/Rac 分子の組み換えタンパク質を混合し、Glutathione Sepharose で pull down した。結合タンパク質を抗 His 抗体または抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。

- (4) EhFP4 と Hrs 由来 FYVE ドメインの高発現による食食への影響。それぞれの FYVE ドメインを GFP との融合タンパク質として発現する赤痢アメーバ株を作成し、赤色呈する 2 μ m カルボキシル化ビーズまたは赤色に染色した CHO 細胞に対する食食活性を 2 色フローサイトメトリー

(FACS)により解析した。ビーズに対する食食活性は変化が見られなかった一方、EhFP4-FYVE 発現細胞では動物細胞への食食活性が約 50% に低下し、Hrs-FYVE を発現細胞では約 2 倍に増加した(図5)。また、FYVE ドメインが EhFP4 の管状の構造への局在を決めていることから、EhFP4 の FYVE ドメインは PtdIns3P ではないシグナルの下流で EhFP4 の局在を決定していると考えられた。



- 図5 EhFP4 または Hrs 由来 FYVE ドメインの食食に対する影響。GFP のみ、GFP-Hrs-FYVE または GFP-EhFP4-FYVE 発現株を用いて 2 μ m カルボキシル化ビーズまたは赤色に染色した CHO 細胞に対する食食活性を食食 10, 30, 60 分後に 2 色 FACS により解析した。
- (5) 本研究より、赤痢アメーバの食食過程に PI3P が重要な目ディエーターであることが示された。PtdIns(3)P のエフェクター分子と考えられた EhFP4 は予想に反してその FYVE ドメインと PtdIns(3)P の結合を示さなかったが、PtdIns(4)P との結合が C-末端領域を介して行われていることが明らかになった(図6)。EhFP4 は主に RhoGEF として食食胞の形成を促していると考えられる。今後 PtdIns(4)P の食食における役割の解明、PtdIns(3)P エフェクター分子の同定が望まれる。

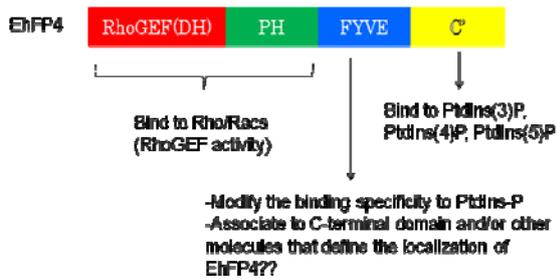


図 6 EhFP4 の機能のまとめ

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1: Nakada-Tsukui K, Saito-Nakano Y, Husain A, Nozaki T. Conservation and function of Rab small GTPases in Entamoeba: Annotation of E. invadens Rab and its use for the understanding of Entamoeba biology. Exp Parasitol. 2010 in press 査読有

2: Yousuf MA, Mi-ichi F, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Localization and targeting of an unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in Entamoeba histolytica. Eukaryot Cell. 2010 9(6):926-33. 査読有

3: Mendoza-Macías CL, Barrios-Ceballos MP, Anaya-Velázquez F, Nakada-Tsukui K, Nozaki T, Padilla-Vaca F. Entamoeba histolytica: molecular cloning and characterization of a novel neutral sphingomyelinase. Exp Parasitol. 2010 125(3):279-85. 査読有

4: Mi-ichi F, Abu Yousuf M, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Mitosomes in Entamoeba histolytica contain a sulfate activation pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 106(51):21731-6. 査読有

5: Maralikova B, Ali V, Nakada-Tsukui K, Nozaki T, van der Giezen M, Henze K, Tovar J. Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulfur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. Cell Microbiol. 2010 12(3):331-42. 査読有

6: Nakada-Tsukui K, Kobayashi Y,

Watanabe N. Characterization of a cDNA encoding guinea pig I3 associated with the delayed-type hypersensitivity reaction. Zoolog Sci. 2009 26(9):617-22. 査読有

7: Nakada-Tsukui K, Okada H, Mitra BN, Nozaki T. Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan Entamoeba histolytica. Cell Microbiol. 2009 11(10):1471-91. 査読有

8: Picazzari K, Nakada-Tsukui K, Sato D, Nozaki T. Analysis of autophagy in the enteric protozoan parasite Entamoeba. Methods Enzymol. 2008;451:359-71. 査読有

9: Ebert F, Bachmann A, Nakada-Tsukui K, Hennings I, Drescher B, Nozaki T, Tannich E, Bruchhaus I. An Entamoeba cysteine peptidase specifically expressed during encystation. Parasitol Int. 2008 57(4):521-4. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1: Unique role of the autophagic pathway in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*
Kumiko Nakada-Tsukui, Karina Picazzari, Kumiko Tsuboi, Tomoyoshi Nozaki
第 32 回日本分子生物学会年会 横浜 2009 年 12 月 9 日 (水) ~12 日 (土)
ポスター発表

2: Identification of a YxxL motif-containing transmembrane protein as a putative receptor of the major virulence factor cysteine protease in the enteric protist Entamoeba histolytica
Kumiko Nakada-Tsukui, Atsushi Furukawa, Yoko Yamada, and Tomoyoshi Nozaki*
49th The Annual Meeting of the American Society for Cell Biology San Diego, CA 2009 年 12 月 5 日 (土) ~9 日 (水)
ポスター発表

3: 赤痢アメーバ等における小胞輸送の多様化と進化
Diversity and evolution of membrane traffic system in Entamoeba species
津久井久美子, Aleyla Escueta, 中野由美子, 野崎智義

第82回日本生化学会大会 神戸 2009年10月21日(水)~24日(土)
シンポジウム

4: イノシトールリン脂質シグナルを介した赤痢アメーバ食食制御機構
津久井久美子、野崎智義

第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム
大阪 2009年10月9日(金)~10日(土)
口頭発表

5: FYVE domain of EhFP4 does not mediate direct binding to PtdIns-Ps, but regulates their specificity

Kumiko Nakada-Tsukui and Tomoyoshi Noza

第61回細胞生物学会大会 名古屋 2009年6月2日(火)~4日(木)
ポスター発表

6: Entamoeba 属シスト化におけるオートファジーの関与

Autophagy in encystation of Entamoeba

津久井久美子、Karina Picazzari-Delgado、野崎知義

第78回日本寄生虫学会大会 東京 2009年3月27日(金)~28日(土)
口頭発表

7: 「寄生性原虫赤痢アメーバの食食機構・共焦点レーザー顕微鏡による動画から見たこと」

津久井久美子 プロテオームのための顕微鏡イメージング勉強会・主催:筑波大学プレ戦略イニシアティブ「地球・生命・人類の持続的共存のための新プロテオームロジー創出へ向けた教育研究拠点形成」2009年3月18日(水)つくば市
招待講演

8: Identification of a putative receptor of the major virulence factor cysteine protease in the enteric protist Entamoeba histolytica

Kumiko Nakada-Tsukui, Atsushi Furukawa, Yoko Yamada, Tomoyoshi Nozaki

XVI Seminario sobre Amebiasis 2009 and EMBO workshop

Amebiasis: Molecular Approaches in an important but Neglected Disease

Guanajuato, Mexico

2009年2月24日(火)~28日(土)
口頭発表

9: A FYVE domain and RhoGEF domain-containing protein involved in

phagocytosis of a mammalian cell by Entamoeba histolytica

Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki

第60回細胞生物学会大会 横浜 2008年6月29日(日)~7月1日(火)
ポスター発表

10: A FYVE and RhoGEF domain-containing protein involved in phagocytosis of a mammalian cell by Entamoeba histolytica

Kumiko Nakada-Tsukui and Tomoyoshi Nozaki

4th International Conference on Anaerobic Protists, Taoyuan, Taiwan, 2008年5月12日(月)~16日(金)

口頭発表

11: 赤痢アメーバ新規システインプロテアーゼ受容体候補分子の同定

A novel candidate protein for E.histolytica cysteine protease receptor

津久井久美子、山田陽子、古川敦、野崎智義

第77回日本寄生虫学会年会 長崎市 2008年4月2日(水)~4日(金)

口頭発表

[図書] (計2件)

1: Genomic and post-genomic approaches to understand the pathogenesis of the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica.

Nakada-Tsukui K and Nozaki T.

In Genomes of Food- and Water-Borne Pathogens. Fratamico P. (Ed)

American Society for Microbiology Press
In press

2: Dissecting the actin cytoskeleton of Entamoeba histolytica from a genomic perspective.

Chung C H, Nakada-Tsukui K, Nozaki T, Guillen N.

In Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology. Clark GC. (Ed)

Caister Academic Press
2010

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nih.go.jp/niid/para/parasite.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津久井久美子 (Tsukui Kumiko)
国立感染症研究所寄生動物部主任研究官
研究者番号：00420092

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：